昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, July 2018, 61(7): 795 – 800 doi:10. 16380/j. kcxb. 2018. 07. 005

# 草地贪夜蛾 Sf9 细胞中 snoRNA Bm-15 反义寡核苷酸的定位及其对 Bm-15 的干涉效率

李新梅，邱妩洁，崔　斌，杨宗霖，申雅文，路一平，阚云超，李丹丹*

（南阳师范学院，河南省伏牛山昆虫生物学重点实验室，河南南阳 473061）

**摘要：**【目的】利用反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASO)干涉昆虫核仁小 RNA(small nucleolar RNA, snoRNA)Bm-15 的表达，并探索 ASO 进入细胞后的代谢途径。【方法】利用脂质体携带 Cy5 标记的、2′-O 核糖甲基化修饰和硫代磷酸骨架修饰的 Bm-15 ASO 转染草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Sf9 细胞，然后通过 Cy5 标记与溶酶体及线粒体免疫荧光探针共定位研究 Bm-15 ASO 在细胞内的转运机制。利用实时荧光定量 PCR 检测转染 Bm-15 ASO 的 Sf9 细胞中 Bm-15 的表达量，分析 ASO 对 snoRNA Bm-15 的干涉效果。【结果】Bm-15 ASO 转染草地贪夜蛾 Sf9 细胞 48 h 后，ASO 荧光信号充斥整个细胞和位于细胞边缘的比例分别为 34% 和 66%，说明 ASO 进入细胞后可能分布在不同的亚细胞器中；进一步对 Bm-15 ASO 和溶酶体及线粒体进行共定位发现，位于细胞边缘的 ASO 大多被运输至溶酶体而不会存在于线粒体等细胞器中。实时荧光定量 PCR 检测结果表明，转染 Bm-15 ASO 的 Sf9 细胞中 Bm-15 表达量下降了 47%。【结论】即使经过多种化学修饰，ASO 仍然逃避不了细胞内源降解机器的识别，这有效解释了某些情况下利用 ASO 干涉基因表达时靶标基因干涉效率较低的现象。

**关键词：**昆虫；草地贪夜蛾；反义寡核苷酸；snoRNA；Bm-15；溶酶体

**中图分类号：**Q522　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2018)07-0795-06

# Cellular location of antisense oligonucleotide of snoRNA Bm-15 and its interference efficiency with Bm-15 in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells

LI Xin-Mei, QIU Wu-Jie, CUI Bin, YANG Zong-Lin, SHEN Ya-Wen, LU Yi-Ping, KAN Yun-Chao, LI Dan-Dan* (Henan Provincial Key Laboratory of Funiu Mountain Insect Biology, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061, China)

**Abstract:**【Aim】To study the interference efficiency of antisense oligonucleotide (ASO) with insect small nucleolar RNA (snoRNA) Bm-15, and to investigate the intracellular delivery of ASO in cells.【Methods】*Spodoptera frugiperda* Sf9 cells were transfected with Cy5-labeled, 2′-O ribosomal methylation and phosphorothioate-modified ASO of Bm-15 through liposome. Co-localization of Bm-15 ASO (labeled with Cy5) and lysosome as well as mitochondria was screened by immunofluorescence. The interference efficiency of ASO with snoRNA Bm-15 was analyzed by detecting the expression level of Bm-15 in Sf9 cells transfected with Bm-15 ASO using real-time PCR.【Results】The proportions of ASO fluorescence signals inundating the whole cell and at the cell edge were 34% and 66%, respectively, in the transfected Sf9 cells after 48 h transfection of Bm-15 ASO, suggesting that ASO might be delivered into different subcellular organelles. Further co-localization analysis showed that Bm-15 ASO was transported

基金项目：国家自然科学基金项目(31100938, 31470114)

作者简介：李新梅，女，1990 年 1 月生，河南洛阳人，硕士研究生，研究方向为昆虫生理生化与分子生物学，E-mail：584990229@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：lidannytc@126.com

收稿日期 Received：2017-12-28；接受日期 Accepted：2018-04-16

into lysosomes but not mitochondria. qPCR result showed that the expression level of Bm-15 decreased by 47% in Sf9 cells transfected with Bm-15 ASO. 【Conclusion】ASO can not escape from the cellular endogenous degradation machinery even after various chemical modifications, and this effectively explains the low interference efficiency of ASO with target gene in some circumstances.

**Key words**: Insect; *Spodoptera frugiperda*; antisense oligonucleotide; snoRNA; Bm-15; lysosome

反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASO)是人工合成的短链核酸(15~25 nt),它们与特定的靶标 RNA 具有序列反向互补特性,进入细胞后可按照碱基互补配对的原则与靶标 RNA 形成双链结构,被 RNA 酶 H(RNase H)识别降解,从而抑制靶标基因的表达。1978 年,Zamecnik 和 Stephenson 首次发现反义寡核苷酸可以在体外抑制病毒的复制(Stephenson and Zamecnik, 1978)。随后人们对 ASO 的设计、作用机理及代谢机理进行了深入研究,并将其应用在疾病治疗中。第一个被美国食品和药物管理委员会(US Food and Drug Administration, FDA)通过的 ASO 药物是用来治疗艾滋病人并发的巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)性视网膜炎,该药通过抑制 CMV 的 mRNA 达到抗病毒效果,疗效显著,展示出了 ASO 巨大的药物应用潜力(Jiang, 2013; Bubela and McCabe, 2014)。随后,另外两个治疗杜氏营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)和治疗脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)的 ASO 药物也被 FDA 相继批准生产(Stein and Castanotto, 2017)。

ASO 到达体内后,能够通过碱基互补配对的原则结合在靶标 RNA 上,形成 RNA-DNA 二聚体,被细胞核或细胞质中的 RNase H 识别切割,导致靶标 RNA 降解或靶标基因翻译抑制(Geary, 2009; Kielpinski *et al*., 2017; Liang *et al*., 2017; Fletcher *et al*., 2017)。不经化学修饰的 ASO 进入细胞后会被细胞识别为外源入侵物,运输入溶酶体中进行降解。因此为增加 ASO 药物的稳定性,经不同化学修饰的 ASO 相继出现,ASO 的化学修饰可大致分为两代,第一代多为 8~50 个碱基不经化学修饰的单链核酸,对靶基因的干涉效率比较低(Opalinska and Gewirtz, 2002; Muntoni and Wood, 2011)。目前应用较多的是第二代修饰,即 5-10-5 gapmer 的 ASO,前 5 个和后 5 个核酸为 2′-O-甲基化修饰的核糖核酸(2′-O-methoxyethyl, MOE),中间 10 个核酸为脱氧核糖核酸,整个 ASO 序列需要硫代磷酸化骨架修饰(Geary *et al*., 2015)。虽然目前二代修饰的 ASO 能够对大多数编码基因和非编码基因达到较好的干涉效果,但是对于一些存在于特殊细胞器中的 RNA,如核仁小 RNA(small nucleolar RNA, snoRNA)等,ASO 的干涉效果在不同靶标基因及不同物种中存在较大的差异。Liang 等(2011)利用 ASO 技术对细胞中 7 个 snoRNA/ScaRNA(small Cajal body-specific RNA)进行干涉,发现干涉效率可达 80%~95%。同时他们将细胞质表达的 7SL(signal recognition particle RNA)的一段 ASO 与细胞核表达的 *U*16 snoRNA 各取部分片段融合为一条 ASO 序列,经过转染后发现,该杂合的 ASO 不但能够抑制细胞质中 7SL 基因的表达,同时还能抑制细胞核中 *U*16 snoRNA 的表达,抑制率达到 50%(Liang *et al*., 2017),表明 ASO 在干涉 snoRNA 方面具有较好的应用前景。

实验室在前期研究中,发现家蚕中一个 C/D box snoRNA Bm-15 除了能够指导 18S rRNA 的甲基化修饰外,还能够与 Notch 受体家族基因通过 12 nt 的碱基互补配对发生体外互作,同时 Bm-15 在草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Sf9 细胞中也存在较高的保守性(Li *et al*., 2011)。为进一步研究该 snoRNA 的功能,我们设计 Bm-15 的 ASO 序列,对 ASO 进入草地贪夜蛾 Sf9 细胞后的定位情况进行了研究,同时对 ASO 干涉 Bm-15 表达的效率进行了探索,为明确 ASO 的作用机理及更好地对其进行改造利用奠定了良好基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试细胞系

所用细胞系为草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Sf9 细胞系,由华南农业大学孙京臣教授惠赠。

### 1.2 主要试剂

CellLight$^{TM}$ Lysosomes-GFP(Thermo Scientific), Mito-Tracker Green(Beyotime), Effectene Transfection Reagent(Qiagen), Trizol RNA 提取试剂(Invitrogen), cDNA 反转录试剂盒(TaKaRa), FastStart Universal SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂(Roche)。

### 1.3 细胞培养及转染

Sf9 细胞在含有 10% FBS 的 Grace's(Gibco)培养基中 28℃恒温爬片培养。待细胞达到 60% 融合度时利用脂质体进行转染，ASO 为经过化学修饰的 5-10-5 gapmer 探针，前 5 个和后 5 个核酸为 2′-O-甲基化修饰的 RNA，中间 10 个 DNA，整个序列需要硫代磷酸化骨架修饰，ASO 的 5′标记 Cy5 荧光标签。Bm-15 ASO 序列为：5′-UGGUUGCGCATTCATAAAGC-3′，转染细胞的 Bm-15 ASO 终浓度为 50 nmol/L，具体转染步骤参照 Qiagen Effectene Transfection Reagent 试剂盒说明进行。

### 1.4 ASO 细胞器定位及荧光观察

ASO 与溶酶体在细胞中的共定位检测：转染 Bm-15 ASO 48 h 的 Sf9 细胞，每 $10^4$ 个细胞加入 2 μL CellLight™ Lysosomes-GFP，37℃孵育 16 h，激光共聚焦显微镜(Nikon TE2000-E)检测 ASO 与溶酶体在细胞中的位置关系。ASO 与线粒体在细胞中的共定位检测：转染 Bm-15 ASO 48 h 的细胞，去除细胞培养液，加入终浓度 20 nmol/L 预热的 Mito-Tracker Green (Beyotime)溶液，37℃孵育 15～45 min，去除 Mito-Tracker Green 染色液，加入 28℃预温育的新鲜细胞培养基孵育 16 h，激光共聚焦显微镜(Nikon TE2000-E)检测 ASO 与线粒体在细胞中的位置关系。

### 1.5 实时荧光定量 PCR

取对数生长期的 Sf9 细胞铺 24 孔板，分别转染 Bm-15 ASO 和阴性对照 *GFP* ASO(ASO 序列为：5′-AACAUCGCCATCTAAUUCAU-3′)，探针终浓度为 50 nmol/L。转染 48 h 后收集 Sf9 细胞，Trizol 法提取总 RNA。取 RNA 各 2 μg，使用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa)合成 cDNA(随机引物)。利用表 1 引物进行 PCR 扩增(FastStart Universal SYBR Green, Roche)。PCR 反应体系(10 μL)：cDNA 0.5 μL，上下游引物(终浓度为 0.5 μmol/L)，FastStart Universal SYBR Green Mix 5 μL。PCR 反应条件：95℃变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，40 个循环。*U6* 为内参基因，生物学重复 3 次，技术重复 3 次。

**表 1　基因/核仁小 RNA PCR 扩增引物**

**Table 1　Primers used in PCR amplification of gene/snoRNA**

| 基因/核仁小 RNA Gene/snoRNA | GenBank 登录号 GenBank accession no. | 引物序列(5′-3′) Primer sequences |
|---|---|---|
| Bm-15 | GU247267.1 | F：ATTCAATGATGATACAATGCTTTATG |
| | | R：AAATTCAGCCATCCAAGGAAGTT |
| *U6* | AY649381 | F：CTAAAATTGGAACGATACAG |
| | | R：ATTTTGCGTGTCATCCTT |

### 1.6 数据统计与分析

1.5 节中 PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量，其中 Ct 为循环阈值，表示每一个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数，ΔCt = 目的基因的平均 Ct 值 − 内参基因的平均 Ct 值，ΔΔCt = ΔCt 样本 1 − ΔCt 样本 2。样品内的标准误差分析应用 SPSS Statistics 22.0 软件，样本之间的差异显著性采用单因素方差分析检测。

## 2 结果

### 2.1 Bm-15 ASO 在草地贪夜蛾 Sf9 细胞中的定位

为了检测 Bm-15 ASO 转染后在草地贪夜蛾 Sf9 细胞中的分布，我们取转染 48 h 的 Sf9 细胞进行荧光观察，结果如图 1 所示，在部分细胞中可观测到均匀的 ASO(标记 Cy5)的荧光信号，但是大部分 ASO 荧光信号位于细胞边缘，统计发现 ASO 探针荧光信号充斥整个细胞和位于细胞边缘的比例分别为 34% 和 66%(3 次重复统计细胞数：282 + 294 + 438 = 1 014)，说明 ASO 进入细胞后可能分布在不同的亚细胞器中。

前人在研究 ASO 的代谢机理中发现，未经修饰的 ASO 会被细胞的胞内体及溶酶体识别降解(Varkouhi *et al*., 2011；Juliano *et al*., 2012；Juliano and Carver, 2015)。为了进一步确认 Bm-15 的 ASO 探针存在于哪一类型的亚细胞器中，我们分别用带有 GFP 荧光的溶酶体标签和 Mito-Tracker Green 的线粒体标签与带有 Cy5 标记的 ASO 进行细胞共定位，结果如图 2 所示。由图 2(A)可知，在草地贪夜蛾 Sf9 细胞中，位于细胞边缘的 ASO 大多被运输至溶酶体中，而不会存在于线粒体等其他细胞器中(图 2：B)，说明经过修饰的 ASO 探针仍然有很大比

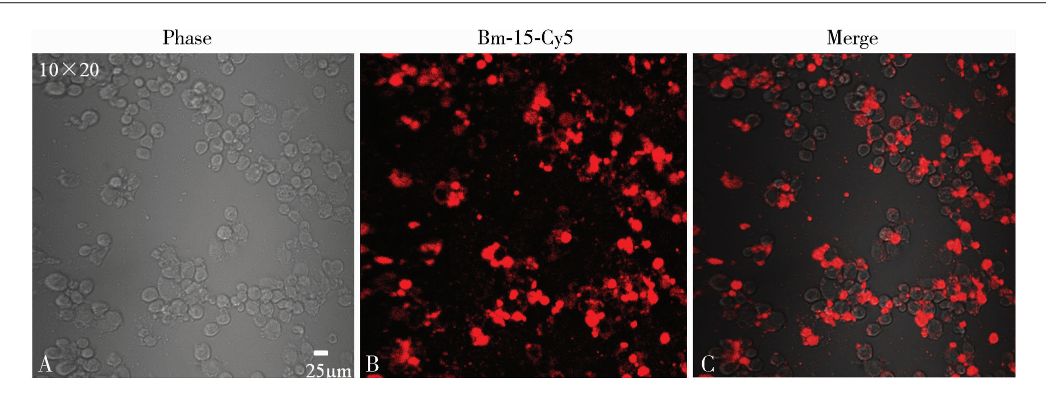



图 1 Bm-15 ASO 转染 48 h 后在草地贪夜蛾 Sf9 细胞中的定位

Fig. 1 Cellular location of Bm-15 ASO in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells after 48 h transfection

Phase 代表白光下细胞状态，Bm-15-Cy5 代表标记有 Cy5 的 ASO 探针在细胞中的分布情况，Merge 为合并后细胞状态。Phase represents the cell state in white light, Bm-15-Cy5 represents the distribution of ASO labeled with Cy5 in the cell, and merge is the overlay image of cell state.

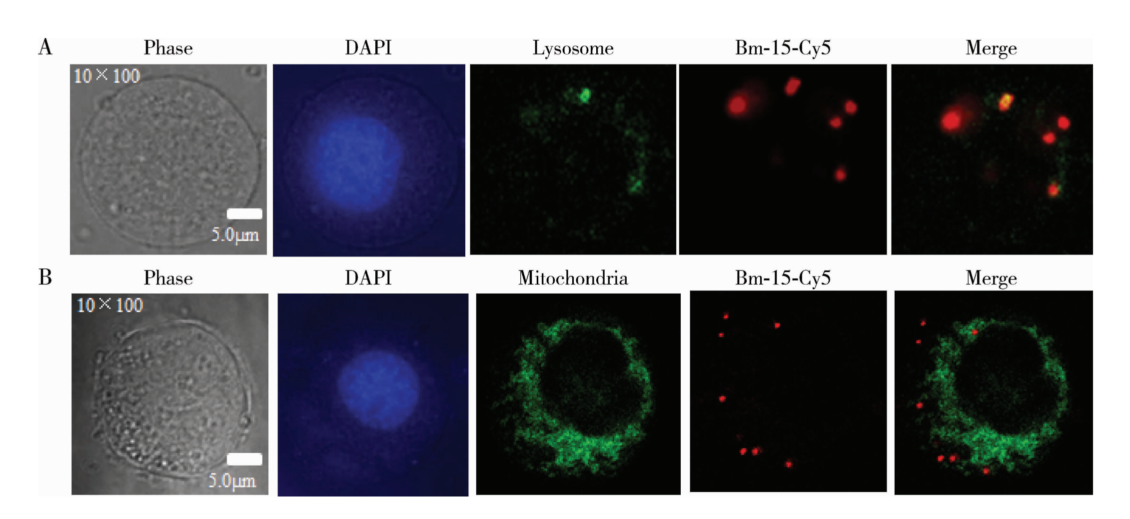



图 2 Bm-15 ASO 与溶酶体荧光标签及线粒体荧光标签在草地贪夜蛾 Sf9 细胞中的共定位

Fig. 2 Co-location of Bm-15 ASO with lysosomal fluorescence tag and mitochondrial fluorescence tag in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells

A: Bm-15 ASO-Cy5 与溶酶体 GFP 标签在 Sf9 细胞中的共定位 Co-localization of Bm-15 ASO-Cy5 with lysosomal GFP tag in Sf9 cells; B: Bm-15 ASO-Cy5 与线粒体 Mito-Tracker Green 标签在 Sf9 细胞中的共定位 Co-localization of Bm-15 ASO-Cy5 with mitochondrial Mito-Tracker Green tag in Sf9 cells. Phase 代表白光下细胞状态，DAPI 为细胞核染色情况，Lysosome 代表溶酶体 GFP 荧光标签在细胞中位置，Mitochondria 代表线粒体 Mito-Tracker Green 标签在细胞中的位置，Bm-15- Cy5 代表标记有 Cy5 的 ASO 探针在细胞中的位置，Merge 为合并后细胞状态。Phase represents the cell state in white light, DAPI represents the stained nucleus, lysosome represents the location of the lysosome with GFP tag, mitochondria represents the location of mitochondria with Mito-Tracker Green tag, Bm-15- Cy5 represents the distribution of ASO labeled with Cy5 in the cell, and merge is the overlay image of cell state.

例逃不过细胞自身防御机器的识别，这也有效解释了某些情况下利用 ASO 干涉基因表达时靶标基因干涉效率较低的现象。

### 2.2 ASO 对草地贪夜蛾 Sf9 细胞中 Bm-15 的干涉效率

由于细胞捕获的 ASO 有很大一部分会进入溶酶体，因此我们进一步检测了 ASO 对 Bm-15 的干涉效率。结果如图 3 所示，转染 ASO 48 h 后 Sf9 细胞中 Bm-15 表达量下降了 47%，说明虽然有近 66% 的 ASO 会被溶酶体捕获，但是仍然有很大一部分能够逃逸出细胞的降解机制，发挥其干涉效应，再次表明 ASO 在 snoRNA 的功能研究中仍然不失为一种有效的干涉手段。

## 3 讨论

从发现反义寡核苷酸能够抑制病毒复制开始，人们对 ASO 的研究、改良及临床应用就没有停止过。目前 ASO 对大多数编码基因和非编码基因都能起到较好的干涉效果，但 ASO 对靶标基因的抑制

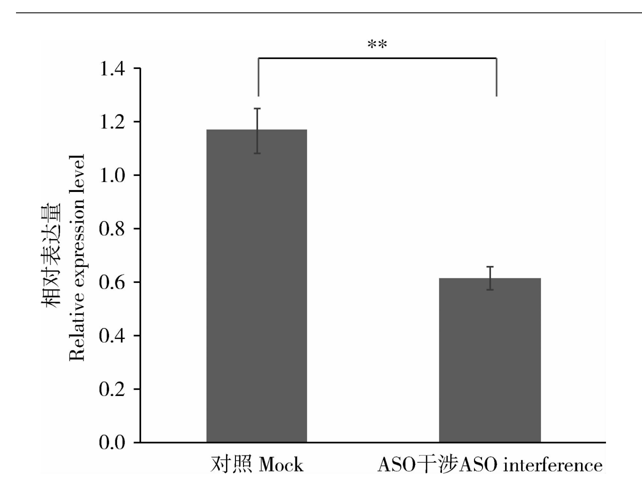



图 3　荧光定量 PCR 检测 ASO 干涉 48 h 后草地贪夜蛾 Sf9 细胞中 Bm-15 的相对表达量

Fig. 3　Relative expression level of Bm-15 in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells at 48 h after ASO interference detected by qPCR

对照为转染 *GFP* ASO 后结果，ASO 干涉为转染 Bm-15 ASO 后结果，双星号表示单因素方差分析结果显示二者表达量差异极显著（$P<0.01$）。Mock represents the result of transfection of *GFP* ASO, and ASO interference is the result of transfection of Bm-15 ASO. Double asterisk represents statistically extremely significant difference by one-way ANOVA ($P<0.01$).

活性还受到其他多种因素的影响，如细胞对 ASO 的吸收能力、ASO 的细胞间分布、靶标 RNA 的可及性和稳定性以及靶标 RNA 的细胞分布等（Dias and Stein，2002；Liang *et al.*，2014，2015；Vickers and Crooke，2014，2015；Lima *et al.*，2014；Castanotto *et al.*，2015；Crooke *et al.*，2017；Bennett *et al.*，2017）。因为经过硫代磷酸骨架修饰的 ASO 可以通过主动运输或被动扩散顺利通过核膜进入细胞核内（Hartig *et al.*，1998；Lorenz *et al.*，2000；Rinaldi and Wood，2018），所以 ASO 在进入细胞后在胞内的运输就成为其发挥作用的一个关键限速步骤。ASO 到达细胞后，首先被细胞表面的整联蛋白（integrins）、清道夫受体（scavenger receptor）及 Toll 样受体（Toll-like receptor）识别（Benimetskaya *et al.*，1997；Butler *et al.*，1997；Robbins *et al.*，2009；Kawai and Akira，2011），经过胞吞作用进入细胞，随后 ASO 要经历细胞内部的早期胞内体、晚期胞内体、囊体及溶酶体识别降解或再次转运才能到达靶标部位发挥作用（Varkouhi *et al.*，2011；Juliano *et al.*，2012；Juliano and Carver，2015），因此 ASO 如何从胞内体进入细胞质中成为其在药物治疗中亟需解决的问题。

本研究通过在昆虫细胞中转染 snoRNA Bm-15 的 ASO 序列，发现有近 66% 的 ASO 进入细胞后被捕获入溶酶体中，导致 Bm-15 表达量只下调了 47%，这也从侧面解释了某些情况下利用 ASO 干涉基因表达时靶标基因干涉效率较低的现象。虽然经过了各种化学修饰，避开溶酶体的识别和降解仍然是 ASO 利用中需要重点关注的问题，如何在 ASO 上添加修饰增强其逃避细胞内的降解机器的识别也将是今后 ASO 药物研发的一个方向。

## 参考文献（References）


Benimetskaya L, Loike JD, Khaled Z, Loike G, Silverstein SC, Cao L, El Khoury J, Cai TQ, Stein CA, 1997. Mac-1 (CD11b/CD18) is an oligodeoxynucleotide-binding protein. *Nat. Med.*, 3(4): 414－420.

Bennett CF, Baker BF, Pham N, Swayze E, Geary RS, 2017. Pharmacology of antisense drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 57(1): 81－105.

Bubela T, Mccabe C, 2014. Value-engineered translation: developing biotherapeutics that align with health-system needs. *Am. J. Manag. Care*, 20: E3.

Butler M, Stecker K, Bennett CF, 1997. Cellular distribution of phosphorothioate oligodeoxynucleotides in normal rodent tissues. *Lab. Invest.*, 77(4): 379－388.

Castanotto D, Lin M, Kowolik C, Wang L, Ren XQ, Soifer HS, Koch T, Hansen BR, Oerum H, Armstrong B, Wang Z, Bauer P, Rossi J, Stein CA, 2015. A cytoplasmic pathway for gapmer antisense oligonucleotide-mediated gene silencing in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, 43(19): 9350－9361.

Crooke ST, Wang S, Vickers TA, Shen W, Liang XH, 2017. Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.*, 35(3): 230－237.

Dias N, Stein CA, 2002. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol. Cancer Ther.*, 1(5): 347－355.

Fletcher S, Bellgard MI, Price L, Akkari AP, Wilton SD, 2017. Translational development of splice-modifying antisense oligomers. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, 17(1): 15－30.

Geary RS, 2009. Antisense oligonucleotide pharmacokinetics and metabolism. *Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol.*, 5(4): 381－391.

Geary RS, Norris D, Yu R, Bennett CF, 2015. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Adv. Drug Dev. Rev.*, 87: 46－51.

Hartig R, Shoeman RL, Janetzko A, Grüb S, Traub P, 1998. Active nuclear import of single-stranded oligonucleotides and their complexes with non-karyophilic macromolecules. *Biol. Cell*, 90(5): 407－426.

Jiang K, 2013. Biotech comes to its 'antisenses' after hard-won drug approval. *Nat. Med.*, 19(3): 252.

Juliano RL, Carver K, 2015. Cellular uptake and intracellular trafficking of oligonucleotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 87: 35－45.

Juliano RL, Ming X, Nakagawa O, 2012. Cellular uptake and intracellular trafficking of antisense and siRNA oligonucleotides. *Bioconjug. Chem.*, 23(2): 147-157.

Kawai T, Akira S, 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5): 637-650.

Kielpinski LJ, Hagedorn PH, Lindow M, Vinther J, 2017. RNase H sequence preferences influence antisense oligonucleotide efficiency. *Nucleic Acids Res.*, 45(22): 12932-12944.

Li DD, Wang YH, Zhang K, Jiao ZJ, Zhu XP, Skogerboe G, Guo XQ, Chinnusamy V, Bi LJ, Huang YP, Dong SL, Chen RS, Kan YC, 2011. Experimental RNomics and genomic comparative analysis reveal a large group of species-specific small non-message RNAs in the silkworm *Bombyx mori*. *Nucleic Acids Res.*, 39(9): 3792-3805.

Liang XH, Nichols JG, Sun H, Crooke ST, 2018. Translation can affect the antisense activity of RNase H1-dependent oligonucleotides targeting mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 46(1): 293-313.

Liang XH, Shen W, Sun H, Prakash TP, Crooke ST, 2014. TCP1 complex proteins interact with phosphorothioate oligonucleotides and can co-localize in oligonucleotide-induced nuclear bodies in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, 42(12): 7819-7832.

Liang XH, Sun H, Nichols JG, Crooke ST, 2017. RNase H1-dependent antisense oligonucleotides are robustly active in directing RNA cleavage in both the cytoplasm and the nucleus. *Mol. Ther.*, 25(9): 2075-2092.

Liang XH, Sun H, Shen W, Crooke ST, 2015. Identification and characterization of intracellular proteins that bind oligonucleotides with phosphorothioate linkages. *Nucleic Acids Res.*, 43(5): 2927-2945.

Liang XH, Vickers TA, Guo S, Crooke ST, 2011. Efficient and specific knockdown of small non-coding RNAs in mammalian cells and in mice. *Nucleic Acids Res.*, 39(3): e13.

Lima WF, Vickers TA, Nichols J, Li C, Crooke ST, 2014. Defining the factors that contribute to on-target specificity of antisense oligonucleotides. *PLoS ONE*, 9(7): e101752.

Lorenz P, Misteli T, Baker BF, Bennett CF, Spector DL, 2000. Nucleocytoplasmic shuttling: a novel *in vivo* property of antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.*, 28(2): 582-592.

Muntoni F, Wood MJ, 2011. Targeting RNA to treat neuromuscular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 10(8): 621-637.

Opalinska JB, Gewirtz AM, 2002. Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 1(7): 503-514.

Rinaldi C, Wood MJA, 2018. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.*, 14(1): 9-21.

Robbins M, Judge A, Maclachlan I, 2009. siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides*, 19(2): 89-102.

Stein CA, Castanotto D, 2017. FDA-approved oligonucleotide therapies in 2017. *Mol. Ther.*, 25(5): 1069-1075.

Stephenson ML, Zamecnik PC, 1978. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75(1): 285-288.

Varkouhi AK, Scholte M, Storm G, Haisma HJ, 2011. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J. Control. Release*, 151(3): 220-228.

Vickers TA, Crooke ST, 2014. Antisense oligonucleotides capable of promoting specific target mRNA reduction via competing RNase H1-dependent and independent mechanisms. *PLoS ONE*, 9(10): e108625.

Vickers TA, Crooke ST, 2015. The rates of the major steps in the molecular mechanism of RNase H1-dependent antisense oligonucleotide induced degradation of RNA. *Nucleic Acids Res.*, 43(18): 8955-8963.

（责任编辑：马丽萍）